

叶用莴苣热激蛋白基因 *LsHsp70-2711* 的克隆及高温胁迫下的功能分析

李雅博, 李婷, 韩莹琰, 范双喜

(北京农学院植物科学技术学院, 北京 102206)

摘要: 【目的】通过克隆 Hsp70 相关基因, 并利用 VIGS 分析叶用莴苣热胁迫下 Hsp70 表达量和形态变化, 为解析热激蛋白基因 *Hsp70* 在高温胁迫下的响应机制及分子机理奠定基础。【方法】通过同源克隆及 RACE 技术, 获得叶用莴苣热激蛋白 *LsHsp70-2711* 的 cDNA 全长序列, 利用实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 分析该基因在不同温度和不同高温时间下的叶用莴苣热敏品种 ‘P-S11’ 和耐热品种 ‘G-S59’ 的表达差异, 确定基因和高温的相关性。根据 VIGS 技术, 构建 pTRV-*LsHsp70-2711* 瞬时沉默载体, 转化农杆菌 GV1301, 注射法侵染叶用莴苣叶片, 三周后经 PCR 鉴定得到阳性植株。对照组和阳性组在基因表达和形态上进行对比, 对照植株和阳性植株热胁迫和干旱处理后再次分析 *LsHsp70-2711* 的表达特性, 观测形态变化。【结果】*LsHsp70-2711* cDNA 全长为 2 226 bp, 开放阅读框为 2 154 bp, 编码 718 个氨基酸, 与拟南芥 (NP_187864.1)、番茄 (NP_001266213.1)、水母雪莲花 (AAB99745.1) 等物种的 Hsp70 同源性达到 80% 以上, 证明此基因属于 Hsp70 家族。根据 qRT-PCR 结果, 高温胁迫下该基因在两个品种中的表达均上调, 在耐热品种中总体表达水平平均高于热敏品种, 耐热品种 *LsHsp70-2711* 的表达量最大值出现在 42℃、60 min, 37℃、60 min 时热敏品种基因表达量达最大值, 且在 42℃ 高温下热敏品种 ‘P-S11’ 中基因表达随着胁迫时间的增加受到抑制, 而耐热品种 ‘G-S59’ 则能长时间保持较高的表达水平, 此结果和田间两品种间耐热差异表现相符合。亚细胞定位显示, *LsHsp70-2711* 主要在细胞质中。将构建好的载体侵入叶用莴苣, 鉴定后获得阳性植株。由定量 PCR 结果可知, 未进行胁迫处理的阳性植株与对照株相比, *LsHsp70-2711* 表达量下降, 茎长明显增长。热胁迫和干旱处理后的阳性植株 *LsHsp70-2711* 表达量显著低于对照植株, 高温处理对 *LsHsp70-2711* 的影响大于干旱胁迫。【结论】*LsHsp70-2711* 属于 Hsp70 基因家族, 其与叶用莴苣耐热性相关。研究结果为解析叶用莴苣热激蛋白 *LsHsp70-2711* 在叶用莴苣高温抽薹方面的功能提供了理论支持。

关键词: 叶用莴苣; Hsp70; 基因克隆; 高温胁迫; 基因沉默

Cloning and Function Analysis of Heat-Shock-Protein *LsHsp70-2711* Gene Under High Temperature Stress in Leaf Lettuce (*Lactuca sativa* L.)

LI YaBo, LI Ting, HAN YingYan, FAN ShuangXi

(College of Plant Science and Technology, Beijing University of Agriculture, Beijing 102206)

Abstract: 【Objective】Through cloning of genes related to Hsp70, and using VIGS to analyze Hsp70 expression and morphological change of leaf lettuce under heat stress to lay a foundation for analysis of the response mechanism and molecular mechanism of heat shock protein under heat stress. 【Method】The full-length cDNA gene of *LsHsp70-2711* gene was obtained by

收稿日期: 2016-09-13; 接受日期: 2016-12-02

基金项目: 国家自然科学基金 (31372057, 31401883)、北京市叶类蔬菜创新团队建设专项 (blvt-02)、北京市农业科技项目 (20140134)、北京市科技成果转化提升计划项目 (PXM2015-D14207 000012)

联系方式: 李雅博, E-mail: 505237137@qq.com. 通信作者范双喜, E-mail: fsx20@163.com

homologous cloning and RACE technology. By real-time fluorescence quantitative PCR (qRT-PCR), the expression of the gene from P-S11 and G-S59 was analyzed. According to the VIGS technology, the pTRV-LsHsp702711 vector was constructed and transformed into *Agrobacterium* GV1301. The leaves of lettuce were infected by the injection method. After three weeks, the positive plants were identified by PCR. The gene expression and morphology were compared between the control group and positive group, and the expression characteristics of *LsHsp70-2711* were analyzed again after heat stress and drought treatment. 【Result】 The sequence analysis indicated that the full-length cDNA was 2226 bp, the open reading frame was 2154 BP, encoding 718 amino acids, and its homology compared with that of *Arabidopsis* (NP_187864.1), tomato (NP_001266213.1), *Saussurea Medusa* (AAB99745.1), and other species. qRT-PCR results showed that the expression of the gene in the two cultivars was up-regulated, and the expression level of heat resistant cultivars was significantly higher than the heat sensitive cultivar, and the gene expression of P-S11 was inhibited by the increase of stress time, and the expression level of G-S59 was higher in the heat resistant variety. In heat resistant variety, the maximum expression of *LsHsp70-2711* appeared at 42°C, 60 min, and the maximum expression of heat sensitive variety reached at 37°C, 60 min. Prediction of subcellular localization showed that *LsHsp70-2711* was mainly in the cytoplasm. The constructed vector was used to invade the leaves of lettuce, and the positive plants were obtained after identification. *LsHsp70-2711* expression decreased after it was silenced by VIGS, compared with the control, the stem length of the positive plants was significantly increased. After heat stress and drought treatment, the expression of *LsHsp70-2711* was significantly lower than the control, and the influence of high temperature treatment on *LsHsp70-2711* was greater than drought stress.【Conclusion】 *LsHsp70-2711* gene belongs to Hsp70 gene family, and is related to the heat resistance in lettuce. The research results of the study will provide theoretical supports for the analysis of function of high temperature in bolting of lettuce.

Key words: *Lactuca sativa* L.; Hsp70; clone; temperature stress; VIGS

0 引言

【研究意义】叶用莴苣 (*Lactuca sativa* L.) 为菊科莴苣属一年或二年生草本植物。由于其叶形美观、营养丰富、所含热量低, 受到消费者青睐, 是中国发展较快的绿叶蔬菜之一, 在提高蔬菜自给率, 保证周年供应中占有重要地位。叶用莴苣性喜冷凉气候, 生长适温为 15—20°C, 对高温胁迫反应敏感而强烈, 超过 30°C 则生长不良, 导致抽薹, 降低食用品质。在许多蔬菜中也都存在热害和“先期抽薹”现象, 由于蔬菜受到热害, 抽薹会失去食用价值, 经济效益降低, 甚至会造成严重的减产或绝收^[1-2]。尤其是近年来, 极端高温天气和持续高温状况的不断出现, 给植物的生长发育和生产带来了巨大挑战, 进一步研究热激蛋白的功能具有重要意义。【前人研究进展】植物在长时间的进化中形成了一套属于自己防御逆境胁迫的机制, 应对高温时, 植物也有相应的抵御机制。在高于正常生长温度 5°C 以上的温度即热激下, 生物体大部分正常蛋白质的合成和 mRNA 的转录被抑制, 同时迅速大量合成一些新的蛋白质称之为热激蛋白^[3]。根据分子量大小将热激蛋白 (HSPs) 分为 6 个家族, Hsp100 家族、Hsp90 家族、Hsp70 家族、Hsp60 家族、Hsp40 家族和小分子 Hsp 家族, 其中 Hsp70 是在生物体内分布最广、进化上最保守、研究最多的一类热激蛋白^[4], 广泛存在于微生物和真核生物的细胞之中, 在细胞核、

细胞质、内质网、线粒体和叶绿体内均有存在^[5]。目前关于 Hsp70 的分子伴侣作用模式研究最清楚的是大肠杆菌 DnaK (HSC70 的一种), 其蛋白结构的研究已取得一些成果^[6-7]。HSP 与植物耐热性相关已在大豆^[8]、烟草^[9]、马铃薯^[10]等相关研究中得到验证。目前在番茄中至少含有 22 个 Hsp70 家族成员的基因、拟南芥中发现至少 18 个, 菠菜中至少有 12 个, 小麦中有 2 个等^[11-12]。高温胁迫条件下 *Hsp70* 能结合部分折叠和变性的蛋白质, 防止其聚集, 协助变性蛋白质重新折叠, 保护细胞免受损害, 也能促进蛋白质折叠成正确的构象^[13-14], 且在正常环境条件下热激蛋白的量占细胞内蛋白总量的 5%, 但受到环境刺激特别是高温胁迫下会大量合成, 从而达到占蛋白总量的 15%^[15]。有研究发现, 在胁迫环境下, Hsp70s 起上调作用, 参与变性蛋白质的重新折叠, 维持细胞环境稳态和保护组织结果免受伤害^[16-19]。在拟南芥细胞质中的 *HSC70-1* 过量表达可有效提高转基因植株的耐热性^[20]; SCAFARO 等^[21]在研究水稻时也证实热激蛋白 Hsp70 与植物耐热性的相关性。QI 等^[22]研究证明水稻线粒体 *HSP70* 的过表达抑制了高温和氧化引起的细胞凋亡, 并且这种抑制作用是通过维持线粒体膜电位差的稳定和抑制活性氧的扩散实现的。在玉米中获得一个 Hsp70 基因 *ZmHsp70*, 该基因在受到 42°C 热激诱导和 4°C 冷胁迫时表达量均有增加, 且在冷胁迫 4 h 时表达量最大^[23]。胡秀丽等^[24]研究表明 Hsp70 对干旱

胁迫也有一定的抵抗作用。【本研究切入点】深入研究植物 Hsp70 在逆境条件下的功能,对正确认识胁迫信号的传导、抗逆相关基因的调控以及提高作物的抗逆性有着重要的指导意义和应用价值。动物中 Hsp70 研究起步较早,功能也较为透彻,现研究证明, Hsp70 具有以下功能:协助新生蛋白的折叠,参与细胞内蛋白质的转运^[25],参与免疫复合物的形成和分解^[26]和降解冗余蛋白。然而,植物 Hsp70 的生理功能研究起步较晚。目前, Hsp70 在植物中的胁迫应答机理、分子伴侣的作用及其在提高植物抗逆性的功能尚不明确。其中叶用莴苣 Hsp70 的相关研究较少。【拟解决的关键问题】以叶用莴苣为对象,通过克隆获得 Hsp70 家族基因,分析其在高温处理下的表达差异。基因瞬时沉默后,观察高温对其 mRNA 表达的影响和茎长变化,为进一步阐明叶用莴苣耐热性的机理提供参考。

1 材料与方 法

1.1 试验材料与试剂、菌株

从 300 个叶用莴苣种质资源中,大田筛选出具有典型抽薹特性的 2 个品种,即热敏品种‘P-S11’和耐热品种‘G-S59’。每个品种各称取 1 g 种子,种子 24 h 催芽后播种于穴盘,待幼苗长到 4—5 片叶时,定植后放入培养箱,培养条件:温度 25℃,光照 12 000 lx,光照/黑暗时间为 16 h/8 h。在光照培养箱中对幼苗进行温度处理,处理温度分别为 25℃(对照)、37℃、42℃,处理时间为 0、15、30、60、120、180、240 和 300 min,取其第 3、4 片叶,-80℃保存备用。

总 RNA 快速提取试剂盒购于艾德莱生物公司;高保真 LA taq 酶、克隆载体 pMD19-T Vector、DH5 α 感受态细胞、RACE 试剂盒购于宝生物工程有限公司;XbaI 酶和 Kpn I 酶、T4 连接酶购于 NEB 生物公司;pTRV、GV3101 农杆菌载体由北京农学院果树系惠赠。

1.2 方 法

1.2.1 叶用莴苣 *LsHsp70-2711* 的克隆 在 GenBank 中查找与基因同源性较高、已公布植物的 *Hsp70* 保守片段,并利用 DNAMAN 软件设计简并引物进行 *Hsp70-2711* 保守序列的扩增。PCR 产物经 1% 的琼脂糖凝胶电泳分离,利用 DNA 凝胶回收试剂盒回收目的条带,回收产物与 pMD19-T 载体连接,转化 DH5 α 大肠杆菌,阳性克隆送华大公司测序。

表 1 叶用莴苣 *LsHsp70-2711* 克隆、表达分析和 Vigs 载体构建所用引物

Table 1 Primers used for cloning, construction of vector and gene expression of *LsHsp70-2711*

引物名称 Primer name	引物顺序 (5'-3') Primer sequence (5'-3')
27-1F	5'-GAATGCCGTCGCTCACTGTCC-3'
27-1 R	5'-GAAGATTGAGAACCCTGTGTG-3'
27-2 F	5'-GCCGGTGGTGTGATGACTGT-3'
27-2 R	5'-CTAAGATGTATCAAGGTGCTGG-3'
27-5'GSP1	5'-GAACTCTTGAACGAAATGGTTGACC-3'
27-5' GSP2	5'-GTCGTTGAAGTAAGCAGGGACAGT-3'
27-3'GSP1	5'-TGATAAGGGGAGGTTGTGCGAAG-3'
27-3'GSP2	5'-TTGGAGGATAAGTTGAAGGAG-3'
2711-Y F	5'-GACTTGTGTCTATTGGATGTCA-3'
2711-Y R	5'-TATCCCTCGTCTTGTCTTTC-3'
2711-V F	5'-GCTCTAGACGCTTCTTCTACTGCTCAG-3'
2711-V R	5'-CGGGGTACCCTTGTCTTCCCTTCG-3'
TRV F	5'-TTACAGGTTATTTGGGCTAG-3'
TRV R	5'-CCGGGTTCAATTCCTTATC-3'
Action	5'-GGAATGGGACAGAAGGAT-3'
Action	5'-CAGTCAGGAGAACAGGGT-3'

1.2.2 叶用莴苣 *LsHsp70-2711* 全长的获得 测序结果于 NCBI 上进行比对,确定与其他植物 *HSP70* 的同源性,测序结果得到的中间片段分别设计基因 5'端和 3'端引物:27-5'GSP1、27-5' GSP2 和 27-3'GSP1、27-3'GSP2。引物 5'端 cDNA 的合成和 3'端 cDNA 的合成按照 5'-Full RACE Kit 和 3'-Full RACE Kit 试剂盒说明书进行。UPM 通用引物由 RACE 试剂盒提供。

1.2.3 *LsHsp70-2711* 表达分析 根据宝生物公司 Real Master Mix (SYBR Green) PCR 试剂盒操作步骤进行,标准品 cDNA 和待测样品均设置 3 次重复。内参及 *LsHsp70-2711* 的引物序列由 Primer Premier 软件设计,目的基因特异性引物:2711-Y F、2711-Y R。按照以下程序进行实时定量反应:94℃预变性 2 min,94℃变性 20 s,55℃退火 30 s,72℃延伸 30 s,40 次循环,每次循环第 3 步进行荧光采集,最后 95℃变性 1 min,退火至 55℃(每隔 10 s 上升 0.15℃)后保温 1 min,接着检测其荧光值,绘制熔点曲线。对‘G-S59’和‘P-S11’两个品种不同温度、不同时间处理的叶片组织进行 *LsHsp70-2711* 实时荧光定量分析。以热敏品种‘P-S11’在 25℃下的叶片表达量为 1,采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算并作图。

1.2.4 *LsHsp70-2711* VIGS 基因沉默体系 选取 *LsHsp70-2711* 开放阅读框中 500 bp 左右的片段设计引物 2711-V F 和 2711-V R。从叶用莴苣 ‘P-S11’ cDNA 中克隆出 500 bp 左右片段。将克隆得到的质粒和 pTRV2 空载体分别双酶切 (*Xba*I 内切酶、*Kpn*I 内切酶)。T4 连接酶连接, 转化后筛选出阳性菌落。最后双酶切鉴定, 测序。将鉴定好的重组质粒转入农杆菌 GV3101 中, 并配置侵染液。

选取长至 4 片叶的 ‘P-S11’ 品种, 用无菌注射器对叶片进行注射。干旱处理: 将侵染第 3 周植株从营养土中取出, 轻轻抖动根部去除土壤, 在干燥的滤纸上室温静置 2 h。热胁迫处理: 侵染 3 周后, 取植株在 37°C 下处理 1 h, 然后 25°C 正常培养。取侵染后第 3 周、2 h 干旱处理和 37°C 热胁迫处理植株嫩叶的 cDNA, 用特异引物 TRV (表 1), PCR 扩增, 检测 TRV 病毒。同时用引物 2711-V (表 1) 对叶用莴苣 *LsHsp70-2711* 做 RT-PCR。通过软件 Quantity One 根据条带的明暗程度进行分析。为观察基因沉默植株形态变化, 分别测量侵染 3、4 周末热胁迫及热胁迫处理一周后的植株茎长。

1.3 数据处理及分析

利用 Excel 软件统计数据并绘制图表, SPSS 进行方差分析。

2 结果

2.1 *LsHsp70-2711* 的克隆

通过测序获得两条长度分别为 822 bp 和 1 065 bp 的中间片段, 拼接后在 NCBI 上进行同源性比较的结

果表明, 与水母雪莲花、番茄、黄瓜等植物的同源性均达 79% 以上, 初步推断所得片段属于 Hsp70 基因家族, 拼接得到 1 424 bp 长度的中间片段。后再通过 5'RACE 和 3'RACE 技术获得 *Hsp70-2711* 的 5'端和 3'端序列, 开放阅读框长度为 2 154 bp, 多次拼接后最终得到 *Hsp70-2711* 基因 cDNA 全长序列为 2 226 bp, 命名该基因为 *LsHsp70-2711*。用 DNAMAN 软件对所得 *Hsp70-2711* 全长 cDNA 序列进行翻译及分析, 结果表明, 该基因编码一个 718 个氨基酸完整开放阅读框。

2.2 叶用莴苣 *LsHsp70-2711* 的蛋白质理化性质和序列分析

使用 InterProScan 在线软件对基因编码的氨基酸序列进行理化性质分析。结果表明, *LsHsp70-2711* 分子量约为 79.69 kD, 理论等电点是 8.58, 总负电荷残基数 (Asp+Glu): 90, 总正电荷残基数 (Arg+Lys): 97, 在氨基酸组成中所占百分比最大的是甘氨酸 Gly (G) 10.3%, 最小的是组氨酸 His (H) 1.4%, 预测半衰期 2 min (*Escherichia coli*, *in vivo*)、2 min (yeast, *in vivo*), 不稳定指数是 35.72, 小于 40, 所以属于稳定蛋白。总平均亲水性系数是 -0.363, 因此预测为亲水性蛋白。

2.3 *LsHsp70-2711* 蛋白同源性分析

将所得氨基酸序列在 NCBI 上用 BLAST 在线软件进行同源性比对, *LsHsp70-2711* 与其他几种植物的 Hsp70 氨基酸同源性在 90% 以上, 进一步推测本试验所得到的基因序列属于 Hsp70 基因家族。采用 DNAMAN 软件分别将氨基酸序列与其他几种植物进行多重序列比对。

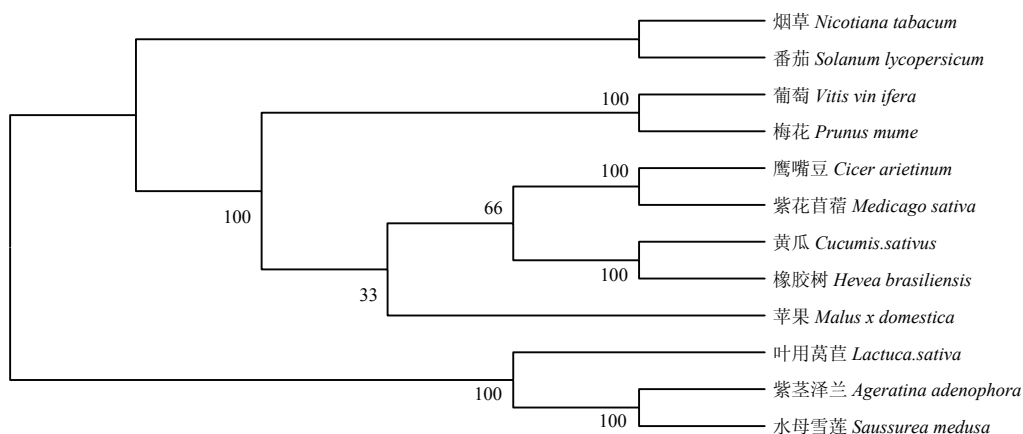


图 1 叶用莴苣 *LsHsp70-2711* 与其他植物 Hsp70 氨基酸系统进化树

Fig. 1 Phylogenetic tree of the deduced amino acid sequences of plant *LsHsp70-2711*

利用 MEGA 5.0 软件, 通过 NCBI 的在线 BLAST 比对, 将数据库中已近登陆的其他物种的 Hsp70 氨基酸序列与本研究得到的叶用莴苣的 LsHsp70-2711 氨基酸序列进行系统进化树分析。结果表明, 叶用莴苣与水母雪莲和紫茎泽兰属于同一分支即亲缘关系与其他植物相比更近 (图 1), 这一结果同在 NCBI 的比对结果相一致。

2.4 亚细胞定位预测

通过在线软件 Wolf psort 对 LsHsp70-2711 蛋白进行亚细胞定位。结果显示: 细胞质 (6)、叶绿体 (2)、线粒体 (3)、内质网 (2)。进一步利用在线预测软件 TargrtP 1.1 对 LsHsp70-2711 蛋白进行亚细胞定位, 二者结果预测显示均主要定位在细胞质中。由此判断, LsHsp70-2711 蛋白主要定位于细胞质中。

2.5 LsHsp70-2711 基因的表达分析

iCycleriQ™ 自动测出的内参基因 18S rRNA 的 PCR 扩增效率和相关系数分别为 97.8 %和 0.999; LsHsp70-2711 扩增效率和相关系数分别为 108.1 %和 0.996。经熔点曲线分析, 18S rRNA 和 LsHsp70-2711 两个基因各自都只有一个 Tm 值, 分别为 87℃ 和 80.5℃。

图 2 为 LsHsp70-2711 在叶用莴苣热敏品种 ‘P-S11’ 中的表达结果, 热激处理 15—300 min 时, 37℃ 处理组 LsHsp70-2711 的表达量是 25℃ 的对照组的 10 倍以上, 42℃ 处理组 LsHsp70-2711 的表达量是对照组的 2 倍以上; 37℃ 热激 60 min 的表达量是 30 min 的 2.1 倍,

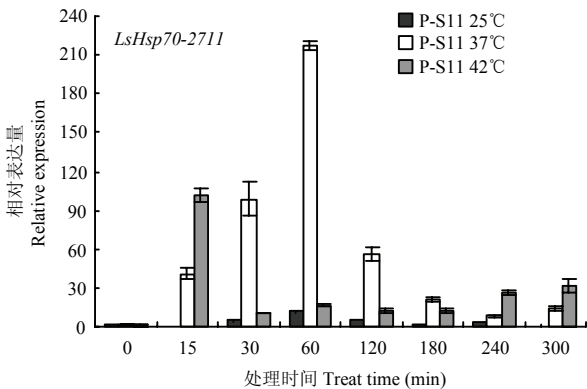


图 2 LsHsp70-2711 在叶用莴苣热敏品种 P-S11 中的表达量分析

Fig. 2 Expression analysis of LsHsp70-2711 of heat-sensitive type P-S11

是 120 min 的 4.1 倍; 42℃ 热激 15 min 的表达量是热激 30 min 的 9.8 倍。分析可知, 与 25℃ 对照相比, 在 37℃ 热激胁迫 15 min 时, LsHsp70-2711 在叶用莴苣品种 ‘P-S11’ 中的表达量迅速升高, 同时随着热激处理时间的延长而表现先升高后降低的趋势; 42℃ 热激处理在 15 min 时出现最大值, 随后变化趋势不明显。两处理表达量均明显高于对照, 说明此基因表达受高温胁迫影响。LsHsp70-2711 表达量的最大值出现在 37℃、60 min, 说明这个基因对两个高温处理均作出响应, 其中对 37℃ 的高温胁迫更显著和更敏感。

图 3 为 LsHsp70-2711 在叶用莴苣耐热品种 ‘G-S59’ 中的表达结果, 37℃ 热激下, 30 min 时 LsHsp70-2711 的表达量达到最高, 是 15 min 的 13.5 倍, 60 min 的 2.3 倍; 42℃ 热激下, 60 min 时 LsHsp70-2711 的表达量达到最高, 是 30 min 的 1.7 倍, 120 min 的 8 倍。与对照相比, 在 37℃ 和 42℃ 的热激处理下, LsHsp70-2711 在 ‘G-S59’ 的表达趋势大致为先升高后降低, 且表达量上也均明显高于对照, 表达趋势与在品种 ‘P-S11’ 中的表达类似。LsHsp70-2711 表达量的最大值出现在 42℃、60 min。

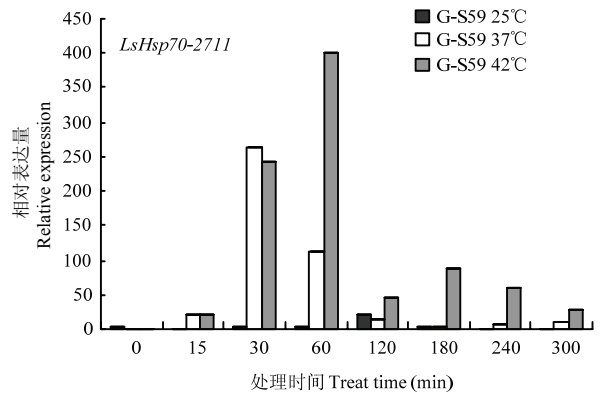


图 3 LsHsp70-2711 在叶用莴苣耐热品种 G-S59 中的表达量分析

Fig. 3 Expression analysis of LsHsp70-2711 of heat-resistant type G-S59

通过图 2 和图 3 对比发现, 在 ‘P-S11’ 和 ‘G-S59’ 中最大值出现时相对应处理条件分别是 37℃ 的 60 min 和 42℃ 的 60 min, 这一结果也证明在相同时间下 ‘G-S59’ 比 ‘P-S11’ 更耐热。在 ‘P-S11’ 中 42℃ 处理下的表达量只在 15 min、240 min、300 min 时比 37℃ 处理时稍高, 其他时间下都比 37℃ 处理时低; 而

在 ‘G-S59’ 中 42℃ 处理的表达量几乎都比 37℃ 下的处理高，说明热敏品种 ‘P-S11’ 比耐热品种 ‘G-S59’ 对高温刺激更加敏感，更易受到高温胁迫的伤害。此结果与试验过程中观察到的在相同热激处理条件下，‘P-S11’ 比 ‘G-S59’ 更早出现萎蔫和萎蔫程度更严重的现象相符合。表明 *LsHsp70-2711* 的表达受到高温诱导，且该基因在耐热品种中的表达高于热敏品种，据此推测 *LsHsp70-2711* 的表达与耐热性有一定的相关性。

2.6 *LsHsp70-2711* VIGS 基因沉默体系

2.6.1 载体构建及农杆菌转化 利用 *LsHsp70-2711* 的特异性引物，以叶用莴苣的 cDNA 为模板扩增出 500 bp 左右的片段。测序结果与 *LsHsp70-2711* 同源性 100%，扩增出的片段即为所需基因片段。将克隆获得的质粒和 pTRV2 空载体分别双酶切，T4 连接酶连接。*Xba*I 和 *Kpn*I 双酶切验证，确定重组质粒中含有 *LsHsp70-2711* 片段。将阳性质粒转入农杆菌 GV3101，用 *LsHsp70-2711* 片段特异引物 PCR 验证，获得 500 bp 左右的片段，表达载体已成功转入到农杆菌 GV3101 中。

2.6.2 分子检测 以空白对照和侵染植株的 cDNA 为模板，用 TRV 的特异引物进行 PCR 扩增。侵染植株的叶片中检测出 600 bp 左右的条带（图 4），未侵染 TRV 病毒的植株叶片中没有检测出条带，结果表明，能检测到病毒特异性条带的植株叶片，说明 TRV 病毒已成功侵入植株中。

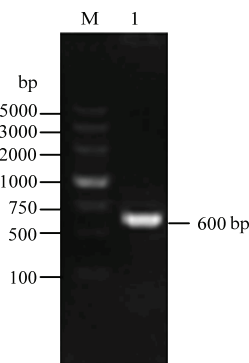


图 4 叶用莴苣 TRV 病毒检测
Fig. 4 Detection of TRV virus in lettuce

2.6.3 侵染病毒的叶用莴苣 *LsHsp70-2711* 相对表达量分析 利用 RT-PCR 技术对不同沉默植株 *LsHsp70-2711* cDNA 的表达水平进行相对定量分析，运用

Quantity One 软件，以 *Action* 为参照。结果表明，侵染 3 周后的阳性植株 *LsHsp70-2711* 表达量在 mRNA 水平上均有所降低。阳性植株中 *LsHsp70-2711* 表达量和阴性对照相比较侵染后基因的相对表达量下降了 60%，37℃ 处理 1 h 的阳性植株与阴性植株相比下降了 48%。在 2 h 干旱处理的叶用莴苣 *LsHsp70-2711* 的相对表达量中，阳性植株的表达量比对照植株低 33%，干旱阳性植株比未处理的阳性植株低 10%。高温处理和干旱处理相比，高温处理对 *LsHsp70-2711* 的表达影响更明显。以上分析表明，构建的叶用莴苣 VIGS 体系能有效降低 *LsHsp70-2711* 转录水平的表达量；热激处理后的植株表达量高于未处理植株，可推测 *LsHsp70-2711* 与叶用莴苣耐热性相关；干旱处理的植株表达量低于未处理植株，可见干旱对 *LsHsp70-2711* 的表达有抑制作用。

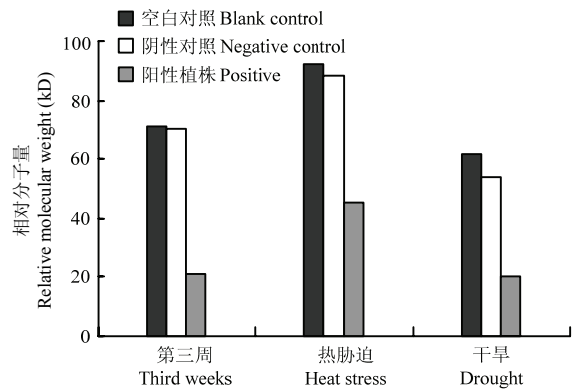
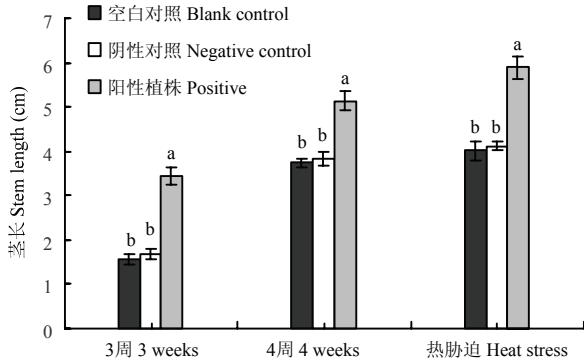


图 5 侵染后叶用莴苣 *LsHsp70-2711* 相对表达量
Fig. 5 Relative expression of *LsHsp70-2711* in lettuce leaves

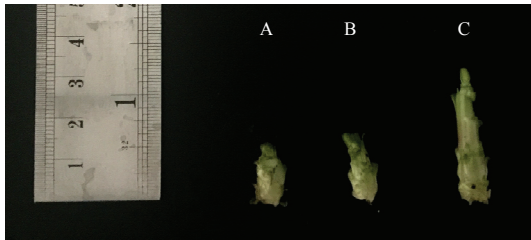
2.6.4 侵染病毒的叶用莴苣的表型性状 从侵染第 3 周开始对照植株和阳性植株茎长都有显著伸长。从图 6 可以看出，第 3 周阴性对照茎长略长于空白对照，但两者间没有明显差异。阴性对照与阳性植株的茎长却有显著差异。第 4 周差异的显著性与第 3 周相似，其中第 3 周到第 4 周期间叶用莴苣的茎长有明显的伸长。侵染 3 周及热胁迫处理的阳性植株与对照植株茎长相比都有明显增长（图 7、8）。结合处理间的数据可知，不同处理期的阳性植株茎长均显著长于对照植株，同时阳性植株 *LsHsp70-2711* 的相对表达量也明显低于对照植株。由此推测，基因沉默抑制了 *LsHsp70-2711* 的表达，使叶用莴苣茎长明显伸长，降

低了叶用莴苣抵抗高温的能力, *LsHsp70-2711* 可能在叶用莴苣耐热方面发挥重要作用。



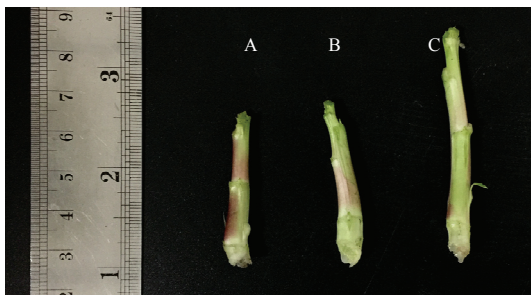
组内不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$)
Different small letters in the same treatment show significant difference ($P < 0.05$)

图 6 侵染 3、4 周及热胁迫处理叶用莴苣的茎长
Fig. 6 Stem length of lettuce in third, fourth week and heat stress



A: 空白对照; B: 阴性对照; C: 侵染植株
A: Blank control; B: Negative control; C: Infected plant

图 7 侵染 3 周后茎长长度
Fig. 7 Stem of the infected leaf after three weeks



A: 空白对照; B: 阴性对照; C: 侵染植株
A: Blank control; B: Negative control; C: Infected plant

图 8 热胁迫 7 d 后茎长长度
Fig. 8 Stem of heat stress after 7 days

3 讨论

目前研究表明, 植物中 Hsp70 基因家族成员广泛参与植物的逆境胁迫和代谢调控^[27]。将本研究所得基因的氨基酸序列与其他物种 Hsp70 的氨基酸序列进行同源性比对分析发现同源性均在 90% 以上, 推测本研究克隆获得的叶用莴苣基因序列属于 Hsp70 基因家族。亚细胞定位预测结果显示, *LsHsp70-2711* 蛋白主要定位于细胞质中, 预测结果与卢承琼等^[28]研究结果相同。

宋洪兵等^[29]通过实时定量 PCR 表达分析表明, 不结球白菜 *BcHSP70-1* 基因的表达量在不同耐热性的栽培种中有较大差异。SRIKANTHBABU 等^[30]研究指出, 经过高温胁迫诱导的豌豆幼苗内 Hsp70 的 mRNA 量增高, 而且经过直接高温胁迫后的豌豆幼苗中 Hsp70 转录物比经过热驯化的幼苗积累量少, 且恢复生长的速度也没有经过热驯化后的幼苗快, 这也说明 Hsp70 对提高植物的耐热性起到一定作用。此研究结果与本研究结果相似, 在一定高温处理下叶用莴苣 *LsHsp70-2711* 过量表达, 说明其与叶用莴苣的耐热性相关。在叶用莴苣热敏型品种 ‘P-S11’ 中, *LsHsp70-2711* 对 37°C 的响应程度显著高于 42°C, 在耐热型品种 ‘G-S59’ 中 *LsHsp70-2711* 是对 42°C 时的响应程度显著高于 37°C, 且耐热品种 ‘G-S59’ 比热敏品种 ‘P-S11’ 更耐高温胁迫。*LsHsp70-2711* 沉默效率较高, 侵染 3 周的基因沉默植株表达量显著低于对照植株, 热胁迫处理和干旱处理的沉默阳性植株表达量也显著低于对照植株。在形态方面, 热胁迫处理和不处理的阳性植株茎长都显著大于对照植株, 这与基因表达量结果相同。相对而言, 叶用莴苣中 *LsHsp70-2711* 的表达在高温处理比干旱处理更明显。因此, 从基因的表达量和形态变化上可以看出, *LsHsp70-2711* 与叶用莴苣的耐热性相关性较大, 干旱也会有抑制作用。下一步计划通过遗传转化方法, 获得 *LsHsp70-2711* 转基因植株, 分析基因表达情况和功能鉴定, 同时结合 *LsHsp70-2711* 蛋白研究, 进一步深化认识植物响应高温胁迫进行适应性生长的分子机制。

4 结论

从叶用莴苣叶片中克隆到 *Hsp70* 的同源基因, 命名为 *LsHsp70-2711*。该基因开放阅读框长度为 2 154 bp, 编码 718 个氨基酸。qRT-PCR 表明 *LsHsp70-2711*

的表达受高温诱导, 且该基因在耐热品种中的表达高于热敏品种, 推断 *LsHsp70-2711* 的表达与耐热性有一定相关性。VIGS 基因沉默体系构建证明 *LsHsp70-2711* 的沉默降低了叶用莴苣抵抗高温的能力, 热胁迫阳性植株在表达量和表型上都显著有别于对照植株, 表明 *LsHsp70-2711* 与叶用莴苣耐热性相关。

References

- [1] MULABAGAL V, NGOUAJIO M, NAIR A. *In vitro* evaluation of red and green lettuce (*Lactuca sativa*) for functional food properties. *Food Chemistry*, 2010, 118: 300-306.
- [2] 许俊强, 汤青林, 宋明, 王志敏. 蔬菜抽薹的遗传规律及机理研究. 长江蔬菜, 2011(8): 7-10.
- XU J Q, TANG Q L, SONG M, WANG Z M. Research on inheritance and mechanism of bolting in vegetables. *Changjiang Vegetables*, 2011(8): 7-10. (in Chinese)
- [3] 王荣青, 万红建, 李志邈, 叶青静, 阮美颖, 周国治, 姚祝平, 杨悦俭. 番茄 Hsp70 基因鉴定及系统发育关系分析. 核农学报, 2014, 28(3): 378-385.
- WANG R Q, WAN H J, LI Z M, YE Q J, RUAN M Y, ZHOU G Z, YAO Z P, YANG Y J. Identification and phylogenetic relationships of Hsp70 genes in tomato. *Nuclear Agricultural Sciences*, 2014, 28(3): 378-385. (in Chinese)
- [4] 齐妍, 徐兆师, 李盼松, 陈明, 李连城, 马有志. 植物热激蛋白 70 的分子作用机理及其利用研究进展. 植物遗传资源学报, 2013, 14(3): 507-511.
- QI Y, XU Z S, LI P S, CHEN M, LI L C, MA Y Z. Research progress on Molecular Mechanism and applicatio of HSP70 in plants. *Plant Genetic Resources*, 2013, 14(3): 507-511. (in Chinese)
- [5] BOSTON R S, VIITANEN P V, VIERLING E. Molecular chaperones and protein folding in plant. *Plant Molecular Biology*, 1996, 32(1/2): 191-222.
- [6] POLIER S, DRAGOVIC Z, HARTL F U. Structural basis for the cooperation of Hsp70 and Hsp110 chaperones in protein folding. *Cell*, 2008, 133: 1068-1079.
- [7] SCHUERMAN J P, JIANG J, CUELLAR J. Structure of the Hsp70: Hsc70 nucleotide exchange machine. *Molecular Cell*, 2008, 31: 232-243.
- [8] LEE G J, POKALA N, VIERLING E. Structure and *in vitro* molecular chaperone activity of cytosolic small heat shock proteins from pea. *Biological Chemistry*, 1995, 270(18): 10432-10438.
- [9] SANMIYA K, SUZUKI K, EGAWA Y, SHONO M. Mitochondrial small heat-shock protein enhances thermotolerance in tobacco plants. *FEBS Letters*, 2004, 55(1/3): 265-268.
- [10] AHN Y J, CLAUSSEN K, ZIMMERMAN J L. Genotypic differences in the heat-shock response and thermotolerance in four potato cultivars. *Plant Science*, 2004, 166(4): 901-911.
- [11] 肖艳萍, 宫伟娜, 万方浩, 李正跃, 谢丙炎. 紫茎泽兰热激蛋白 70 基因的克隆与序列分析. 中国农业科技导报, 2010, 12(1): 111-117.
- XIAO Y P, GONG W N, WAN F G, LI Z Y, XIE B Y. Cloning and sequence analysis of heat shock protein 70 gene from *Ageratina adenophora*. *Agricultural Science and Technology*, 2010, 12(1): 111-117. (in Chinese)
- [12] 安艳秋, 蔺瑞明, 芦冯晶, 王风涛, 徐世昌, 许玉凤. 小麦热激蛋白基因 TaHSP70 克隆及其在植物防卫和抗逆反应中的表达分析. 分子植物育种, 2011, 9(4): 402-409.
- AN Y Q, LIN R M, FENG J, WANG F T, XU S C, XU Y F. Cloning of heat shock protein gene TaHSP70 from wheat and its expression in plant defense and anti reverse reaction. *Molecular Plant Breeding*, 2011, 9(4): 402-409. (in Chinese)
- [13] SUN Y, MACRAE T H. The Small heat shock proteins and their role in human disease. *FEBS Journal*, 2005, 272(11): 2613-2627.
- [14] TANAKA K I, NAMBA T, ARAI Y, FUJIMOTO M, ADACHI H, SOBUE G, TAKEUCHI K, NAKAI A, MIZUSHIMA T. Genetic evidence for a protective role for heat shock factor and heat shock protein 70 against colitis. *Biological Chemistry*, 2007, 282: 23240-23252.
- [15] FRACY E, SERPENTINI A, FIEVET B, LEBEL J M. Identification of cDNAs encoding HSP70 and HSP90 in the abalone *Haliotis tuberculata*: Transcriptional induction in response to thermal stress in hemocyte primaryculture. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B*, 2007, 146: 540-550.
- [16] 赵雁, 毕玉芬, 邵辰光. 牧草和饲料作物蛋白质变化与耐热性的关系. 云南农业大学学报(自然科学版), 2012, 27(3): 440-446.
- ZHAO Y, BI Y F, SHAO C G. The relationship between protein changes and heat tolerance of forage and feed crops. *Yunnan Agricultural University (Natural Science Edition)*, 2012, 27(3): 440-446. (in Chinese)
- [17] HARTL F, HAYER-HARTL M. Molecular chaperones in the cytosol from nascent chain to folded protein. *Science*. 2002, 295: 1852-1858.
- [18] JOLLY C, MORIMOTO R. Stress and the cell nucleus: Dynamics of gene expression and structural reorganization. *Gene Expression*, 1999, 7: 261-270.
- [19] MYCKO, CWIKLINSKA M P, WALCZAK H, LIBERT A, RAINE C, SELMAJ C S, KRZYSZTOF W. A heat shock protein gene (Hsp70) is critically involved in the generation of the immune response to myelin

- antigen. *European Journal of Immunology*, 2008, 38: 1999-2013.
- [20] SUNG D Y, GUY C. Physiological and molecular assessment of altered expression of Hsc70-1 in *Arabidopsis* evidence for pleiotropic consequences. *Plant Physiology*, 2003, 132: 979-987.
- [21] SCAFARO A P, HAYNES P A, ATWELL B J. Physiological and molecular changes in *Oryza meridionalis* Ng., A heat-tolerant species of wild rice. *Journal of Experimental Botany*, 2010, 61(1): 191-202.
- [22] QI Y C, WANG H J, ZOU Y. Over-expression of mitochondrial heat shock protein 70 suppresses programmed cell death in rice. *FEBS Journal*, 2011, 585: 231-239.
- [23] 李慧聪, 郭秀林, 王冬梅. 玉米热激蛋白 70 基因对温度胁迫的响应. 河北农业大学学报, 2010, 33(6): 12-15.
- LI H C, GUO X L, WANG D M. Responses of HSP70 gene expression to temperature stresses in maize. *Journal of Agricultural University of Hebei*, 2010, 33(6): 12-15. (in Chinese)
- [24] 胡秀丽, 李艳辉, 杨海荣. HSP70 可提高干旱高温复合胁迫诱导的玉米叶片抗氧化防护能力. 作物学报, 2010, 36(4): 636-644.
- HU X L, LI Y H, YANG H R. Heat shock protein 70 may improve the ability of antioxidant defense induced by the combination of drought and heat in maize leaves. *Acta Agronomica Sinica*, 2010, 36(4): 636-644. (in Chinese)
- [25] PRATT W B, TOFT D O. Regulation of signaling protein function and trafficking by the hsp90/hsp70-based chaperone machinery. *Experimental Biology and Medicine*, 2003, 228: 111-133.
- [26] YOUNG J C, BARRAL J M, ULRICH HARTL F. More than folding: localized functions of cytosolic chaperones. *Trends in Biochemical Sciences*, 2003, 28: 541-547.
- [27] SUNG D, VIERLING E, GUY C L. Comprehensive expression profile analysis of the *Arabidopsis* Hsp70 gene family. *Plant Physiology*, 2001, 126(2): 789-800.
- [28] 卢承琼, 曾其伟, 向仲怀, 何宁佳. 桑树小分子热激蛋白基因的鉴定及在逆境胁迫下的表达. 蚕业科学, 2014, 40(6): 965-973.
- LU C Q, ZENG Q W, XIANG Z H, HE N J. Identification of Mulberry small heat shock protein genes and their expression under abiotic stresses. *Science of Sericulture*, 2014, 40(6): 965-973. (in Chinese)
- [29] 宋洪兵, 宋小明, 周晶晶, 刘环环, 李英, 侯喜林. 不结球白菜 BcHSP70-1 基因的克隆与进化及其表达分析. 西北植物学报, 2013, 33(8): 1508-1515.
- SONG H B, SONG X M, ZHOU J J, LIU H H, LI Y, HOU X L. Phylogenetic and expression analysis of BcHSP70-1 gene from brassica campestris ssp. chinensis. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 2013, 33(8): 1508-1515. (in Chinese)
- [30] SRIKANTHBABU V, GANESHKUMAR, KRISHNAPRASAD B T. Identification of pea genotypes with enhanced thermotolerance using temperature induction response technique (TIR). *Plant Physiology*, 2002, 159: 535-545.

(责任编辑 赵伶俐)